

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

10/507446
JP03/02946
13 SEP 2004
12.03.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日
Date of Application:

2002年 3月15日

出願番号
Application Number:

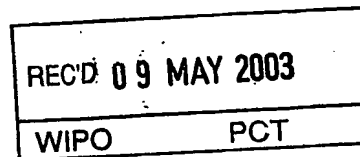
特願2002-072931

[ST.10/C]:

[JP2002-072931]

出願人
Applicant(s):

株式会社ミツカングループ本社

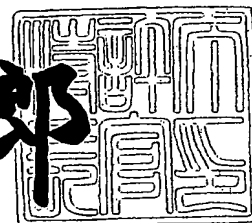


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 4月22日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2003-3028931

【書類名】 特許願

【整理番号】 6561

【提出日】 平成14年 3月15日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

 【住所又は居所】 愛知県半田市港本町2-24

 【氏名】 後藤 英嗣

【発明者】

 【住所又は居所】 愛知県知多郡阿久比町卯坂字坂部28

 【氏名】 中野 繁

【特許出願人】

 【識別番号】 398065531

 【住所又は居所】 愛知県半田市中村町2丁目6番地

 【氏名又は名称】 株式会社 ミツカングループ本社

 【代表者】 代表取締役社長 中埜 又左エ門

【代理人】

 【識別番号】 100075775

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 戸田 親男

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 067287

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 要約書 1

 【物件名】 図面 1

 【包括委任状番号】 9900374

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 酢酸耐性に関与する遺伝子、該遺伝子を用いて育種された酢酸菌、及び該酢酸菌を用いた食酢の製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記の (A)、又は (B) に示すタンパク質 S P T。

(A) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、酢酸耐性を増強する機能を有するタンパク質。

【請求項 2】 下記の (A)、又は (B) に示すタンパク質 S P T をコードする遺伝子の D N A。

(A) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、酢酸耐性を増強する機能を有するタンパク質。

【請求項 3】 下記の (a)、又は (b) に示す D N A である請求項 2 に記載の遺伝子の D N A。

(a) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列のうち、塩基番号 1 8 7 ~ 1 3 8 6 からなる塩基配列を含む D N A。

(b) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列のうち、塩基番号 1 8 7 ~ 1 3 8 6 からなる塩基配列又はその一部を有するプローブと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、酢酸耐性を増強する機能を有するタンパク質をコードする D N A。

【請求項 4】 請求項 2、又は請求項 3 に記載の D N A の細胞内のコピー数が増幅されたことにより、酢酸耐性が増強された微生物。

【請求項 5】 微生物がアセトバクター属、又はグルコンアセトバクター属の酢酸菌であることを特徴とする請求項 4 に記載の微生物。

【請求項 6】 請求項 4、又は請求項 5 に記載の微生物のうち、アルコール酸化能を有するものを、アルコールを含有する培地で培養して該培地中に酢酸を

生成蓄積せしめることを特徴とする食酢の製造方法。

【請求項 7】 請求項 2、又は請求項 3 に記載の DNA を含んだ組換えプラスミド pUSPT (FERM BP-7932)。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、微生物に由来する酢酸耐性を増強する機能を有するタンパク質をコードする遺伝子、これのコピー数を増幅した微生物、特にアセトバクター属 (Acetobacter) 及びグルコンアセトバクター属 (Gluconacetobacter) に属する酢酸菌、及びこれらの微生物を用いて高濃度の酢酸を含有する食酢を効率良く製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

酢酸菌は食酢製造に広く利用されている微生物であり、特にアセトバクター属及びグルコンアセトバクター属に属する酢酸菌が工業的な酢酸発酵に利用されている。

酢酸発酵では、培地中のエタノールが酢酸菌によって酸化されて酢酸に変換され、その結果、酢酸が培地中に蓄積することになるが、酢酸は酢酸菌にとっても阻害的であり、酢酸の蓄積量が増大して培地中の酢酸濃度が高くなるにつれて酢酸菌の増殖能力や発酵能力は次第に低下する。

【0003】

そのため、酢酸発酵においては、より高い酢酸濃度でも増殖能力や発酵能力が低下しないこと、すなわち酢酸耐性の強い酢酸菌を開発することが求められており、その一手段として、酢酸耐性に関与する遺伝子 (酢酸耐性遺伝子) をクローニングし、その酢酸耐性遺伝子を用いて酢酸菌を育種、改良することが試みられている。

【0004】

これまでの酢酸菌の酢酸耐性遺伝子に関する知見としては、アセトバクター属の酢酸菌の酢酸耐性を変異させて酢酸感受性にした株を元の耐性に回復させるこ

とのできる相補遺伝子として、クラスターを形成する3つの遺伝子 (a a r A、a a r B、a a r C) がクローニングされていた (ジャーナル・オブ・バクテリオロジー (J. Bacteriol.)、172巻、2096頁、1990年)。

【0005】

この内、a a r A遺伝子はクエン酸合成酵素をコードする遺伝子であり、又、a a r C遺伝子は酢酸の資化に関係する酵素をコードする遺伝子であると推定されたが、a a r B遺伝子については機能が不明であった (ジャーナル・オブ・フアーメンテーション・アンド・バイオエンジニアリング (J. Ferment. Bioeng.)、76巻、270頁、1993年)。

【0006】

これらの3つの酢酸耐性遺伝子を含む遺伝子断片をマルチコピープラスミドにクローニングし、アセトバクター・アセチ・サブスペシズ・ザイリナム I F O 3 2 8 8 (*Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* IF03288) 株に形質転換して得られた形質転換株は、酢酸耐性の向上レベルが僅かではなく、また実際の酢酸発酵での能力の向上の有無については不明であった (特開平3-219878号公報)。

【0007】

一方、酢酸菌からクローニングされた膜結合型アルデヒド脱水素酵素 (A D H) をコードする遺伝子を酢酸菌に導入することによって、酢酸発酵において最終到達酢酸濃度の向上が認められた例が特開平2-2364号公報に開示されている。しかし、A D Hはエタノールを酸化する機能を有する酵素であって酢酸耐性に直接関係する酵素ではないことから、A D Hをコードする遺伝子が真に酢酸耐性遺伝子であるとは断定できないものであった。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

以上のように、従来より酢酸菌の酢酸耐性を遺伝子レベルで解明し、高い酢酸耐性を有する実用酢酸菌の開発に成功した例は報告されていない。しかし、酢酸耐性にすぐれた酢酸菌が開発されれば、従来より高濃度の酢酸発酵が行われ、高濃度酢酸、高濃度食酢の効率的製造が可能となることから、本発明者らは、再度

、酢酸菌の酢酸耐性の向上を遺伝子レベルで解明することとした。

【0009】

そして本発明者らは、各方面から検討した結果、酢酸耐性を実用レベルで向上させうる機能を有するタンパク質をコードする新規な酢酸耐性遺伝子を取得し、また取得した酢酸耐性遺伝子を用いて、より強い酢酸耐性を有する酢酸菌を育種することが重要であるとの観点にたち、酢酸菌に属する微生物由来の酢酸耐性に関与する新規な遺伝子を提供すること、及び該遺伝子を用いて微生物の酢酸耐性を向上させる方法、特に酢酸菌に属する微生物の酢酸耐性を向上させる方法、さらに酢酸耐性が向上した酢酸菌を用いて、より高酢酸濃度の食酢を効率良く製造する方法を提供することを新規技術課題として新たに設定した。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、酢酸存在下でも増殖し、発酵することができる酢酸菌には、他の微生物には存在しない特異的な酢酸耐性に関与する遺伝子が存在するとの仮説を立て、こうした遺伝子を用いれば、従来以上に微生物の酢酸耐性を向上させることができ、さらには高濃度の酢酸を含有する従来得ることができなかった新規食酢の効率的な製造法を開発することが可能になるとの新規着想を得た。

【0011】

従来の酢酸耐性遺伝子の取得方法は、酢酸菌の酢酸感受性の変異株を相補する遺伝子をクローニングする方法などが一般的であった。

【0012】

しかし、このような方法では産業上有用な酢酸耐性遺伝子を見出すことは困難であると考え、鋭意検討した結果、本発明者らは、酢酸菌から酢酸耐性遺伝子を見出す方法として、酢酸菌の染色体DNAライブラリーを構築し、この染色体DNAライブラリーを酢酸菌に形質転換し、通常1%程度の酢酸の存在下でしか生育できない株を、2%の酢酸の存在下でも生育可能にする遺伝子をスクリーニングすることによって取得する方法を開発した。

この方法によって、実際に食酢製造に用いられているグルコンアセトバクター属の酢酸菌から、酢酸耐性を実用レベルで向上させる機能を有する新規な酢酸耐

性遺伝子をクローニングすることにはじめて成功した。

【0013】

得られた酢酸耐性遺伝子は、DDBJ/EMBL/Genbank及びSWISS-PROT/PIRにおいてホモロジー検索した結果、スフィンゴモナスなどで見出されているスフィンゴ脂質合成の第一段階を触媒するセリンパルミトイルトランスフェラーゼ (serine palmitoyltransferase) と称されるタンパク質と相同性を示しており、酢酸菌のセリンパルミトイルトランスフェラーゼをコードする遺伝子であると推定された。

【0014】

しかし、これまでに原核生物からセリンパルミトイルトランスフェラーゼの遺伝子が取得されたのは前記のスフィンゴモナス属の例のみである。

さらに、取得された酢酸菌のセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子は、スフィンゴモナス属で見出されている既知のセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子とはアミノ酸配列レベルで46.3%の、またマウスのそれとは25%前後の相同性であり、その相同性の程度は極めて低いものであったことから、他のセリンパルミトイルトランスフェラーゼ遺伝子とある程度は似ているものの、酢酸菌に特異的な新規タンパク質 (タンパク質SPTということもある) をコードする新規遺伝子であることが確認された。

【0015】

また、該遺伝子をプラスミドベクターに連結して酢酸菌に形質転換し、コピー数を増幅させた形質転換株においては、顕著に酢酸耐性が向上し、その結果、エタノール存在下で該形質転換株を通気培養した場合に、増殖誘導期が短縮する上に、増殖速度、生酸速度が向上すると共に、さらに最終到達酢酸濃度が顕著に向上することなどを見出し、更に該タンパク質のアミノ酸配列、及びそれをコードする遺伝子DNAの塩基配列の決定にも成功し、本発明を完成するに至った。

【0016】

すなわち本発明の実施態様は下記のとおりである。

(1) 下記の(A)、又は(B)に示すタンパク質SPT。

(A) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、酢酸耐性を増強する機能を有するタンパク質。

【0017】

(2) 下記の (A)、又は (B) に示すタンパク質 SPT をコードする遺伝子の DNA。

(A) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、酢酸耐性を増強する機能を有するタンパク質。

【0018】

(3) 下記の (a)、又は (b) に示す DNA である上記 (2) に記載の遺伝子の DNA。

(a) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列のうち、塩基番号 187～1386 からなる塩基配列を含む DNA。

(b) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列のうち、塩基番号 187～1386 からなる塩基配列又はその一部を有するプローブと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、酢酸耐性を増強する機能を有するタンパク質をコードする DNA。

【0019】

(4) 上記 (2)、又は (3) に記載の DNA の細胞内のコピー数が増幅されたことにより、酢酸耐性が増強された微生物。

(5) 微生物がアセトバクター属、又はグルコンアセトバクター属の酢酸菌であることを特徴とする上記 (4) に記載の微生物。

【0020】

(6) 上記 (4)、又は (5) に記載の微生物のうち、アルコール酸化能を有するものを、アルコールを含有する培地で培養して該培地中に酢酸を生成蓄積せしめることを特徴とする食酢の製造方法、及び、それによって得られた酢酸含量が高い (10～12.5%) 新規な食酢。

【0021】

(7) 上記(2)、又は(3)に記載のDNAを含んだ組換えプラスミドpUSPT (FERM BP-7932)。

【0022】

(8) 少なくとも配列表の配列番号1に示す塩基配列を有するDNA断片を含んでなる組換えプラスミドであって、例えば、酢酸菌-大腸菌シャトルベクター(マルチコピーベクター) pMV24にこのDNA断片を挿入してなるプラスミドpSPT、及び/又は、このプラスミドpSPTをアセトバクター・アセチ (*Acetobacter aceti*) No. 1023 (FERM BP-2287) に導入してなる形質転換体。

【0023】

本発明によれば、微生物に対して、酢酸に対する耐性を付与し、増強することができる。そして、アルコール酸化能を有する微生物、特に酢酸菌においては、酢酸に対する耐性が顕著に向上し、培地中に高濃度の酢酸を効率良く蓄積する能力を付与することができる。

【0024】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0025】

(1) 本発明のDNA

本発明のDNAは、スフィンゴモナス属のセリンパルミトイルトランスフェラーゼとある程度の相同性を有し、且つ酢酸耐性を向上させる機能を有する配列表の配列番号2に示すアミノ酸配列を有するタンパク質をコードし得る塩基配列を包含し、該塩基配列の調整要素、及び該遺伝子の構造部分を含む。

【0026】

本発明のDNAは、グルコンアセトバクター・エンタニイ (*Gluconacetobacter entanii*) の染色体DNAから次のようにして取得することができる。

まず、グルコンアセトバクター・エンタニイ、例えばアセトバクター・アルトアセチゲネスMH-24 (*Acetobacter altoacetigenes* MH-24) 株(特許生物寄

託センターにFERM BP-491として寄託)の染色体DNAライブラリーを調製する。なお、染色体DNAは特開昭60-9489号公報に開示された方法により取得する。

【0027】

次に、得られた染色体DNAから酢酸耐性遺伝子を単離するために、染色体DNAライブラリーを作製する。まず、染色体DNAを適当な制限酵素で部分分解して種々のDNA断片混合物を得る。切断反応時間などを調節して切断の程度を調節すれば、幅広い種類の制限酵素が使用できる。例えば、Sau3AIを温度30℃以上、好ましくは37℃、酵素濃度1~10ユニット/mlで様々な時間(1分~2時間)、染色体DNAに作用させてこれを消化する。なお、後記実施例ではPstIを用いた。

【0028】

次いで、切断された染色体DNA断片を、酢酸菌内で自律複製可能なベクターDNAに連結し、組換えDNAを作製する。具体的には、染色体DNAの切断に用いた制限酵素PstIと相補的な末端塩基配列を生じさせる制限酵素、例えばPstIを温度30℃、酵素濃度1~100ユニット/mlの条件下で、1時間以上ベクターDNAに作用させてこれを完全消化し、切断開裂する。

【0029】

次いで、上記のようにして得た染色体DNA断片混合物と切断開裂されたベクターDNAを混合し、これにT4DNAリガーゼを温度4~16℃、酵素濃度1~100ユニット/mlの条件下で1時間以上、好ましくは6~24時間作用させて組換えDNAを得る。

【0030】

得られた組換えDNAを用いて、通常は寒天培地上で1%よりも高濃度の酢酸の存在下では増殖することのできない酢酸菌、例えばアセトバクター・アセチ1023株(Acetobacter aceti No.1023)株(特許生物寄託センターにFERM BP-2287として寄託)を形質転換し、その後2%酢酸含有寒天培地に塗布し、培養する。そこで生じたコロニーを液体培地に接種して培養し、得られる菌体からプラスミドを回収することで酢酸耐性遺伝子を含むDNA断片を得るこ

とができる。

【0031】

本発明のDNAとして、具体的には、配列表の配列番号1の塩基配列を有するDNAが挙げられるが、その内、塩基番号187～1386からなる塩基配列はコーディング領域である。

【0032】

配列番号1に示す塩基配列もしくは配列番号2に示すアミノ酸配列（図3：塩基番号187～1386に対応）は、DDBJ/EMBL/Genbank及びSWISS-PROT/PIRにおいてホモロジー検索したところ、アミノ酸配列レベルでスフィンゴモナス・ポーチモビリス (*Sphingomonas paucimobilis*) のSPT1遺伝子と46.3%、マウスのLCB1遺伝子、LCB2遺伝子とも26.3%、24.8%の相同性を示し、セリンパルミトイルトランスフェラーゼをコードする遺伝子であることが推定されたが、いずれも50%以下の低い相同性であり、これらの遺伝子とは異なる新規なものであることが明白であった。なお、上記のSPT遺伝子などが、酢酸耐性と関係していることは全く知られていない。

さらに、本発明のDNAは、すでに取得されている酢酸菌の酢酸耐性遺伝子（*aarA*、*aarB*、*aarC*）や酢酸耐性を増強する機能を有するADH遺伝子などとも異なる新規な酢酸耐性を増強する機能を有する遺伝子であると同定された。

【0033】

本発明のDNAは、その塩基配列が明らかとなったので、例えば、鋳型として酢酸菌グルコンアセトバクター・エンタニイのゲノムDNAを用い、該塩基配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドをプライマーに用いるポリメラーゼ・チェーン・リアクション（PCR反応）（トレンズ・オブ・ジェネテックス (Trends Genet.) 5巻、185頁、1989年）によって、または該塩基配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドをプローブとして用いるハイブリダイゼーションによっても得ることができる。

【0034】

オリゴヌクレオチドの合成は、例えば、市販されている種々のDNA合成機を用いて定法に従って合成できる。また、PCR反応は、アプライドバイオシステムズ社（Applied Biosystems）製のサーマルサイクラーGene Amp PCR System 2400を用い、Taq DNAポリメラーゼ（宝酒造社製）やKOD-Plus（東洋紡績社製）などを使用して、定法に従って行なうことができる。

【0035】

本発明の酢酸耐性を増強する機能を有するタンパク質をコードするDNAは、コードされるタンパク質の酢酸耐性を増強する機能が損なわれない限り、1又は複数の位置で1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、又は付加されたタンパク質をコードするものであっても良い。

【0036】

このような酢酸耐性を増強する機能を有するタンパク質と実質的に同一のタンパク質をコードするDNAは、例えば部位特異的変異法によって、特定の部位のアミノ酸が欠失、置換、挿入、又は付加されるように塩基配列を改変することによっても取得され得る。また、上記のような改変されたDNAは、従来知られている突然変異処理によっても取得することができる。

【0037】

また、一般的にタンパク質のアミノ酸配列およびそれをコードする塩基配列は、種間、株間、変異体、変種間でわずかに異なることが知られているので、実質的に同一のタンパク質をコードするDNAは、酢酸菌全般、中でもアセトバクター属やグルコンアセトバクター属の種、株、変異体、変種から得ることが可能である。

【0038】

具体的には、アセトバクター属やグルコンアセトバクター属の酢酸菌、又は変異処理したアセトバクター属やグルコンアセトバクター属の酢酸菌、これらの自然変異株若しくは変種から、例えば配列表の配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基配列番号187～1386からなる塩基配列を有するDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、酢酸耐性を増強する機能を有するタンパク質をコードするDNAを単離することによっても、該タンパク質と実質的に同一

のタンパク質をコードするDNAが得られる。ここでいうストリンジェントな条件とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNAどうし、例えば70%以上の相同性を有するDNAどうしがハイブリダイズし、それより相同性が低いDNAどうしがハイブリダイズしない条件、あるいは通常のハイブリダイゼーションの洗浄条件、例えば1×SSCで0.1%SDSに相当する塩濃度で60℃で洗浄が行われる条件などが挙げられる。

【0039】

(2) 本発明の酢酸菌

本発明の酢酸菌はアセトバクター属及びグルコンアセトバクター属の細菌を指し、酢酸耐性が増強されたアセトバクター属細菌及びグルコンアセトバクター属細菌である。

【0040】

アセトバクター属細菌として具体的には、アセトバクター・アセチ (*Acetobacter aceti*) が挙げられ、アセトバクター・アセチ No. 1023 (*Acetobacter aceti* No.1023) 株 (特許生物寄託センターにFERM BP-2287として寄託) が例示される。

また、グルコンアセトバクター属細菌としては、グルコンアセトバクター・エンタニイ (*Gluconacetobacter entanii*) が挙げられ、現在特許生物寄託センターにFERM BP-491として寄託されているアセトバクター・アルトアセチゲネスMH-24 (*Acetobacter altoacetigenes* MH-24) 株が例示される。

【0041】

酢酸耐性の増強は、例えば酢酸耐性遺伝子の細胞内のコピー数を増幅すること、又は、該遺伝子の構造遺伝子を含むDNA断片をアセトバクター属細菌中で効率よく機能するプロモーター配列に連結して得られる組換えDNAを用いて、アセトバクター属細菌を形質転換することによって増強することができる。

また、染色体DNA上の該遺伝子のプロモーター配列を、アセトバクター属やグルコンアセトバクター属の細菌中で効率よく機能する他のプロモーター配列、

例えば大腸菌のプラスミド pBR322 のアンピシリン耐性遺伝子、プラスミド pACYC177 のカナマイシン耐性遺伝子、プラスミド pACYC184 のクロラムフェニコール耐性遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子などの各遺伝子のプロモーターなどの酢酸菌以外の微生物由来のプロモーター配列に置き換えることによって、酢酸耐性を増強することができる。

【0042】

該遺伝子の細胞内コピー数の増幅は、該遺伝子を保持するマルチコピーベクターをアセトバクター属細菌の細胞に導入することによって行なうことができる。すなわち、該遺伝子を保持するプラスミド、トランスポゾン等をアセトバクター属やグルコンアセトバクター属の細菌の細胞に導入することによって行なうことができる。

【0043】

マルチコピーベクターとしては、pMV24 (アプライド・オブ・エンバイロメント・アンド・マイクロバイオロジー (Appl. Environ. Microbiol.) 55 巻、171 頁、1989 年) や pTA5001 (A)、pTA5001 (B) (特開昭 60-9488 号公報) などが挙げられ、染色体組み込み型ベクターである pMVL1 (アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー (Agric. Biol. Chem.) 52 巻、3125 頁、1988 年) も挙げられる。また、トランスポゾンとしては、Mu や IS1452 などが挙げられる。

【0044】

アセトバクター属やグルコンアセトバクター属の酢酸菌への DNA の導入は、塩化カルシウム法 (アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー (Agric. Biol. Chem.) 49 巻、p.2091、1985 年) や電トロポレーション法 (バイオサイエンス・バイオテクノロジー・アンド・バイオケミストリー (Biosci. Biotech. Biochem.)、58 巻、974 頁、1994 年) 等によって行なうことができる。

【0045】

アルコール酸化能を有するアセトバクター属やグルコンアセトバクター属の酢酸菌において、上記のようにしてその酢酸耐性を増強すると、酢酸の生産量や生

産効率を増大させることができる。

【0046】

(3) 食酢製造法

上記のようにして、酢酸耐性遺伝子のコピー数が増幅されたことにより酢酸耐性が選択的に増強されたアセトバクター属やグルコンアセトバクター属の細菌であって、アルコール酸化能を有するものをアルコール含有培地で培養し、該培地中に酢酸を生産蓄積せしめることにより、食酢を効率よく製造することができる。

【0047】

本発明の製造法における酢酸発酵は、従来の酢酸菌の発酵法による食酢の製造法と同様にして行なえば良い。酢酸発酵に使用する培地としては、炭素源、窒素源、無機物、エタノールを含有し、必要があれば使用菌株が生育に要求する栄養源を適当量含有するものであれば、合成培地でも天然培地でも良い。

炭素源としては、グルコースやシュクロースをはじめとする各種炭水化物、各種有機酸が挙げられる。窒素源としては、ペプトン、発酵菌体分解物などの天然窒素源を用いることができる。

【0048】

また、培養は、静置培養法、振とう培養法、通気攪拌培養法等の好氣的条件下で行ない、培養温度は通常30℃で行なう。培地のpHは通常2.5～7の範囲であり、2.7～6.5の範囲が好ましく、各種酸、各種塩基、緩衝液等によって調製することもできる。通常1～21日間の培養によって、培地中に高濃度の酢酸が蓄積する。

【0049】

(4) 本発明の実施態様

また、本発明に係るORF又はそれを含有する酢酸耐性遺伝子（配列番号1）を大腸菌ベクター（マルチコピーベクター）pUC19に挿入してなる組換えプラスミドpUSPTは、特許生物寄託センターにFERM BP-7932として寄託されているので、本発明に係る遺伝子のDNAは容易に入手することができる。そして、所望するのであれば、

この組換えプラスミドを用いて、本発明に係るORF又はそれを含有する酢酸耐性遺伝子を、酢酸菌で自律複製可能なベクターにのせかえ、これを酢酸菌に導入し、これを培養することにより酢酸含量の高い食酢を容易に製造することができる。

【0050】

更にまた、上記したようにそしてまた後記する実施例からも明らかなように、酢酸耐性遺伝子源の寄託、PCRの態様、プラスミドベクター、組換えプラスミドの作製、宿主菌の寄託その他が明らかにされており、いずれも入手ないし操作、処理が容易であるので、実施例にしたがって各操作、処理を行えば、目的とする酢酸耐性形質転換体を得ることができ、これを使用することにより高濃度の酢酸を製造することができる。したがって、この点からしても、本発明の実施は容易である。

【0051】

以下に、本発明を実施例により具体的に説明する。

【0052】

【実施例】

(実施例1) グルコンアセトバクター・エンタニイからの酢酸耐性遺伝子のクローニングと塩基配列及びアミノ酸配列の決定

【0053】

(1) 染色体DNAライブラリーの作製

グルコンアセトバクター・エンタニイ (*Gluconacetobacter entanii*) の1株であるアセトバクター・アルトアセトゲネスMH-24 (*Acetobacter altoacetigenes* MH-24) 株 (FERM BP-491) を6%酢酸、4%エタノールを添加したYPG培地 (3%グルコース、0.5%酵母エキス、0.2%ポリペプトン) で30℃にて振盪培養を行なった。培養後、培養液を遠心分離 (7,500 × g、10分) し、菌体を得た。得られた菌体より、特開昭60-9489号公報に開示された方法により、染色体DNAを調製した。

【0054】

上記のようにして得られた染色体DNAを制限酵素Pst I (宝酒造社製) で

部分消化し、また大腸菌-酢酸菌シャトルベクター pMV24 を制限酵素 Pst I で完全消化して、切断した。これらの DNA を適量ずつ混合し、ライゲーションキット (TaKaRa DNA Ligation Kit Ver.2、宝酒造社製) を用いて連結してグルコンアセトバクター・エンタニイの染色体 DNA ライブラリーを構築した。

【0055】

(2) 酢酸耐性遺伝子のクローニング

上記のようにして得られたグルコンアセトバクター・エンタニイの染色体 DNA ライブラリーを、通常は寒天培地上で酢酸濃度 1% 程度までしか増殖出来ないアセトバクター・アセチ No. 1023 株 (FERM BP-2287) に形質転換した。

その後、形質転換されたアセトバクター・アセチ No. 1023 株を、2% 酢酸、100 μ g/ml のアンピシリンを含む YPG 寒天培地で、30℃ で 4 日間培養した。

【0056】

そこで生じたコロニーを 100 μ g/ml のアンピシリンを含む YPG 培地に接種して培養し、得られた菌体からプラスミドを回収したところ、図 1 に示した約 4 kbp の Pst I 断片がクローン化されたプラスミドが回収でき、このプラスミドを pP1 と命名した。さらに 2% 酢酸を含有する YPG 寒天培地でアセトバクター・アセチ No. 1023 株を生育可能にする DNA 断片は、pP1 にクローン化された約 4 kbp の Pst I 断片中の約 2 kbp の EcoRV-Bal I 断片であることが確認できた。

【0057】

このようにして通常は寒天培地上で酢酸濃度 1% 程度までしか増殖出来ないアセトバクター・アセチ No. 1023 株を 2% 酢酸含有寒天培地でも増殖可能にする酢酸耐性遺伝子断片を取得した。

【0058】

(3) クローン化された DNA 断片の塩基配列の決定

上記のクローン化された EcoRV-Bal I 断片を pUC19 の Sma I 切断部位に挿入し、該断片の塩基配列を、サンガーのダイデオキシ・チェーン・タ

一ミネーション法によって決定した結果、配列番号1に記載した塩基配列が決定された。配列決定は両方のDNA鎖の全領域について行ない、切断点は全てオーバーラップする様に行なった。

【0059】

配列番号1記載の塩基配列中には、塩基番号187から塩基番号1386にかけて、配列番号2に記載したような400個のアミノ酸(図3)をコードするオープンリーディング・フレーム(ORF)の存在が確認された。

【0060】

(実施例2) グルコンアセトバクター・エンタニイ由来の酢酸耐性遺伝子で形質転換した形質転換株での酢酸耐性の増強

【0061】

(1) アセトバクター・アセチへの形質転換

上記の様にしてクローン化されたアセトバクター・アルトアセトゲネスMH-24 (*Acetobacter altoacetigenes* MH-24) 株 (FERM BP-491) 由来の酢酸耐性遺伝子を、KOD-Plus (東洋紡績社製) を用いてPCR法によって増幅し、増幅したDNA断片を酢酸菌—大腸菌シャトルベクターpMV24 (アプライド・オブ・エンバイロメント・アンド・マイクロバイオロジー (Appl. Environ. Microbiol.) 55巻、171頁、1989年) の制限酵素Sma I切断部位に挿入したプラスミドpSPTを作製した。pSPTに挿入された増幅断片の概略を図1に示した。

【0062】

PCR法は次のようにして実施した。すなわち、鋳型として上記酢酸菌由来のゲノムDNAを用い、プライマーとしてプライマー1 (その塩基配列を配列番号3 (図4) に示す) 及びプライマー2 (その塩基配列を配列番号4 (図5) に示す) を用い、下記する条件にて、PCR法を実施した。

すなわち、PCR法は94℃15秒、60℃30秒、68℃2分を1サイクルとして、30サイクル行った。

【0063】

このpSPTをアセトバクター・アセチNo. 1023株にエレクトロポレー

ション法（バイオサイエンス・バイオテクノロジー・アンド・バイオケミストリー（Biosci. Biotech. Biochem.）、58巻、974頁、1994年）によって形質転換した。形質転換株は $100\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリン及び2%の酢酸を添加したYPG寒天培地で選択した。

【0064】

選択培地上で生育したアンピシリン耐性の形質転換株について、定法によりプラスミドを抽出して解析し、酢酸耐性遺伝子を保有するプラスミドを保持していることを確認した。

【0065】

（2）形質転換株の酢酸耐性

上記のようにして得られたプラスミドpSPTを有するアンピシリン耐性の形質転換株について、酢酸を添加したYPG培地での生育を、シャトルベクターpMV24のみを導入した元株アセトバクター・アセチNo. 1023株と比較した。

【0066】

具体的には、エタノール3%とアンピシリン $100\mu\text{g}/\text{ml}$ を含有する100mlのYPG培地と、エタノール3%、酢酸3%とアンピシリン $100\mu\text{g}/\text{ml}$ を含有する100mlのYPG培地のそれぞれに、pSPTを有する形質転換株とシャトルベクターpMV24を有する元株を接種し、30℃で振とう培養（150rpm）を行ない、形質転換株と元株の酢酸添加培地での生育を660nmにおける吸光度を測定することで比較した。

【0067】

その結果、図2に示すように、酢酸を含有しない培地では形質転換株及び元株はほぼ同様の増殖が可能であったのに対し、3%酢酸と3%エタノールを添加した培地では、形質転換株は増殖が可能であるのに対して、元株アセトバクター・アセチNo. 1023株は増殖できないことが確認でき、酢酸耐性遺伝子の酢酸耐性増強機能が確認できた。

【0068】

（実施例3）グルコンアセトバクター・エンタニイ由来の酢酸耐性遺伝子で形質

転換した形質転換株の酢酸発酵試験

【0069】

実施例2で得られたプラスミドpSPTを有するアンピシリン耐性の形質転換株について、シャトルベクターpMV24のみを有する元株アセトバクター・アセチNo. 1023株と酢酸発酵能を比較した。

【0070】

具体的には、5Lのミニジャー（三ツワ理化学工業社製；KMJ-5A）を用いて、酢酸1%、エタノール4%、アンピシリン100 μ g/mlを含む2.5LのYPG培地にて、30℃、400rpm、0.20vvmの通気攪拌培養を行ない、酢酸濃度3%まで発酵させた。その後、700mlの培養液をミニジャー中に残して培養液を取り出し、残った700mLに対して酢酸3%、エタノール4%、アンピシリン100 μ g/mlを含む1.8LのYPG培地を添加して再び酢酸発酵を開始させ、途中培地中のエタノール濃度が1%を維持するようにエタノールを添加しつつ通気攪拌培養を継続して、形質転換株と元株の酢酸発酵能を比較した。その結果を表1にまとめた。

【0071】

【表1】

	最終到達酢酸濃度 (%)	比増殖速度 (OD660/h r)	生産速度 (%/h r)	増殖誘導期 (h r)
元株	9.5	0.0151	0.103	62.5
形質転換株	11.1	0.0323	0.136	24.0

【0072】

表1の結果から、形質転換株の方が、最終到達酢酸濃度、比増殖速度、生産速度、増殖誘導期の何れにおいても、顕著に優れていることが確認できた。

【0073】

【発明の効果】

本発明により、酢酸耐性に関与する新規な遺伝子が提供され、さらに該遺伝子を用いてより高酢酸濃度の食酢を高効率で製造可能な育種株を取得することができ、更に、該育種株を用いたより高酢酸濃度の食酢を高効率で製造する方法の提

供が可能となった。

【 0 0 7 4 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Mitsukan Group Corporation

<120> Structural gene responsible for acetic acid resistance in acetic acid bacteria, acetic acid bacteria transformed with said gene, and acetic acid fermentation using said transformants.

<130> 6561

<141> 2002-3-15

<160> 4

<210> 1

<211> 2016

<212> DNA

<213> Gluconacetobacter entanii

<400> 1

gatataaatg gcagcagcaa gatcgttgag gatctggcct ttgattcact ggccgtcatg 60

aattttgtca tggaaatcga ggacacgctc gacgtttccg tgccgcttga ccggctggct 120

gatatacgca ccattgatga tctggctgcc tgtatcgtct ctctcaagca ggcatacctga 180

tacaccatgt cgattttctc gaaatatgaa ggccttgctg ccgccctgtc ggcggtaacg 240

gccgatgggtg ggcgcaaccc gttcaacgtc gtgatcgaaa agcccatttc ctccacggctc 300

gggctgatcg aagggcgga gacgcttctg ttcggcacca acaactatct tgggctgagc 360

cagtccccgg ccgcgatcga agcggcggtg gaagccgcca gggcttatgg tgcggcacg 420

accggatcgc gcatacgcaa tggcacgcag ggtctgcacc gccagttgga agagcggctg 480

tgcaccttct tccgtcgtcg gcaactgcag gtgttttcca ccggttacca ggccaatctg 540

ggcacgattt ccgcactggc gggcaaggac gattatctgc tgcttgatgc ggacagccat 600

gccagcatct atgatggcag ccgccttggc catgcgcagg tcatccgctt ccgtcacaa 660

gacgccgatg acctgcataa acgcctgcgc cgccttgatg gtacgcccg agcgaaactg 720

gtcgtggctc aaggcatcta ttccatgatg ggcgacgtcg ttcccatggc ggaattcgcg 780

gccgtcaagc gggaaaccgg tgcattggctg ctggcggatg aagcacattc cgttggtgta 840
 atgggcgaac atggccgtgg cgtggcgga tccgacggcg tggaagatga tgtcgatttt 900
 gtcgtcggca ccttttccaa aagccttggc acggttggtg gctactgtgt ttccaacat 960
 gccgggctgg acctgatccg gctgtgttcg cgtccgtaca tgttcaccgc atccctgccg 1020
 ccggaagtca tcgccgcgac catggccgcg ctgactgaac tggaaaaccg gccggaactg 1080
 cgcgtgcggt tgatggacaa tgcacgcagg cttcatgacg ggctgcaggc ggccggcctg 1140
 cgcaccggcc cgcaggccag tcctgtcgtg tccgtcattc tggatgatgt ggcggttgcc 1200
 gtggcgttct ggaaccggct gctggacctt ggggtttacg tcaacctcag cctgccgcct 1260
 gcaacgccc accagcatcc cctgtcgcgg acctccgtca tggcgacca tacgccggag 1320
 cagatagacc gggccgtgga aatcttcgcc gttgtagcgg gcgagatggg tatcaaccgc 1380
 gccgcctgaa aaaacctgcc tgccgtaatt tccacagcag atacggcagg cagaccagcg 1440
 gatgccgttc cgaaaacggc cccagcggca gttcaatgcc ggaatgccgc ctgatcttcc 1500
 atgcgatata gcgcgcgcca ccttcaaacc tgaaggcccc cttgaacagg cggctgacat 1560
 tcagcacgcg cccagccga ccacgcagcc accagccttc gtacatcttc cggcgagtt 1620
 caggtgtcag ctgggggggtt agttgatcgc cctcagaccg gaacggcagg ccatcggcgc 1680
 gccatacatc cggcagcagg cgctgtacc gtgcttcttg cccctgtagc aggctacgcg 1740
 gcctgcggcc gttctccaca cgcagttccg caccgtaagt atgggcgaac agggccagcc 1800
 agtagtcac ggccgtgccc tgtgccggac ccagggcggc agcccagcgc cccgcctgcc 1860
 ccaccgcgcg gataatgcag gccaggatgg catcgccgc gtccggttcc ctgaccata 1920
 caagccgcac aggctggcag aagcgtgccc agaccgtggt atccaacgtg gcgcgtccc 1980
 tcatcggcg gaactgcgt atggacagga tggcca 2016

<210> 2

<211> 400

<212> PRT

<213> Gluconacetobacter entanii

<400> 2

Met Ser Ile Phe Ser Lys Tyr Glu Gly Leu Ala Ser Ala Leu Ser Ala

5

10

15

Val Thr Ala Asp Gly Gly Arg Asn Pro Phe Asn Val Val Ile Glu Lys

20	25	30
Pro Ile Ser Ser Thr Val Gly Leu Ile Glu Gly Arg Glu Thr Leu Leu		
35	40	45
Phe Gly Thr Asn Asn Tyr Leu Gly Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ala Ile		
50	55	60
Glu Ala Ala Val Glu Ala Ala Arg Ala Tyr Gly Val Gly Thr Thr Gly		
65	70	75
Ser Arg Ile Ala Asn Gly Thr Gln Gly Leu His Arg Gln Leu Glu Glu		
85	90	95
Arg Leu Cys Thr Phe Phe Arg Arg Arg His Cys Met Val Phe Ser Thr		
100	105	110
Gly Tyr Gln Ala Asn Leu Gly Thr Ile Ser Ala Leu Ala Gly Lys Asp		
115	120	125
Asp Tyr Leu Leu Leu Asp Ala Asp Ser His Ala Ser Ile Tyr Asp Gly		
130	135	140
Ser Arg Leu Gly His Ala Gln Val Ile Arg Phe Arg His Asn Asp Ala		
145	150	155
Asp Asp Leu His Lys Arg Leu Arg Arg Leu Asp Gly Thr Pro Gly Ala		
165	170	175
Lys Leu Val Val Val Glu Gly Ile Tyr Ser Met Met Gly Asp Val Val		
180	185	190
Pro Met Ala Glu Phe Ala Ala Val Lys Arg Glu Thr Gly Ala Trp Leu		
195	200	205
Leu Ala Asp Glu Ala His Ser Val Gly Val Met Gly Glu His Gly Arg		
210	215	220
Gly Val Ala Glu Ser Asp Gly Val Glu Asp Asp Val Asp Phe Val Val		
225	230	235
Gly Thr Phe Ser Lys Ser Leu Gly Thr Val Gly Gly Tyr Cys Val Ser		
245	250	255

Asn His Ala Gly Leu Asp Leu Ile Arg Leu Cys Ser Arg Pro Tyr Met
260 265 270

Phe Thr Ala Ser Leu Pro Pro Glu Val Ile Ala Ala Thr Met Ala Ala
275 280 285

Leu Thr Glu Leu Glu Asn Arg Pro Glu Leu Arg Val Arg Leu Met Asp
290 295 300

Asn Ala Arg Arg Leu His Asp Gly Leu Gln Ala Ala Gly Leu Arg Thr
305 310 315 320

Gly Pro Gln Ala Ser Pro Val Val Ser Val Ile Leu Asp Asp Val Ala
325 330 335

Val Ala Val Ala Phe Trp Asn Arg Leu Leu Asp Leu Gly Val Tyr Val
340 345 350

Asn Leu Ser Leu Pro Pro Ala Thr Pro Asp Gln His Pro Leu Leu Arg
355 360 365

Thr Ser Val Met Ala Thr His Thr Pro Glu Gln Ile Asp Arg Ala Val
370 375 380

Glu Ile Phe Ala Val Val Ala Gly Glu Met Gly Ile Asn Arg Ala Ala
385 390 395 400

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

ctggctgcct gtatcgtctc tctcaagcag

30

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

acggctgcag ctggtctgcc tgccgtatct

【図面の簡単な説明】

【図 1】

P s t I を用いてクローニングされたグルコンアセトバクター・エンタニイ由来の遺伝子断片（p P 1）の制限酵素地図と酢酸耐性遺伝子の位置、及び p S P T への挿入断片の概略図。

【図 2】

酢酸耐性遺伝子のコピー数を増幅した形質転換株の培養経過を示す図面。

【図 3】

本酢酸耐性遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列（配列番号 2）を示す。

【図 4】

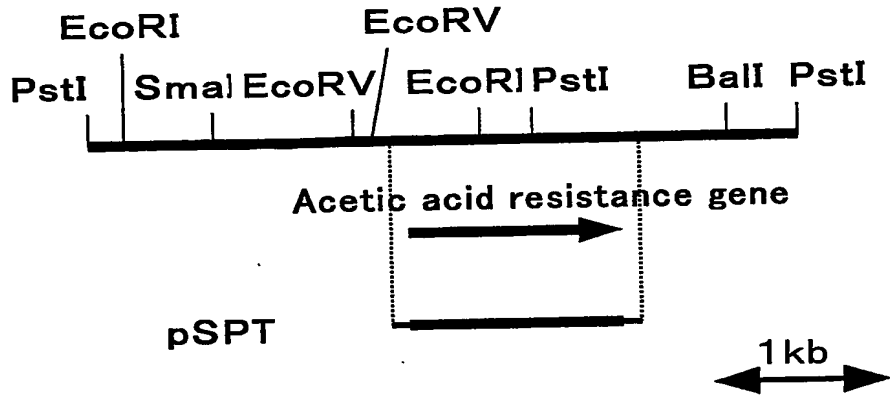
プライマー 1 を示す。

【図 5】

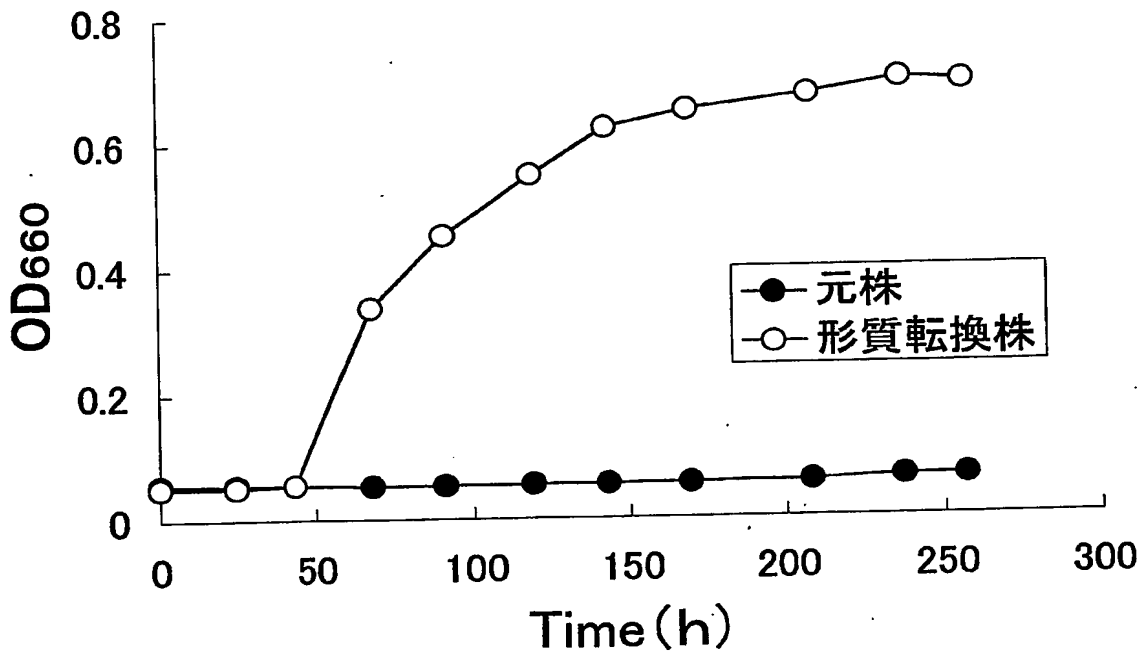
プライマー 2 を示す。

【書類名】 図面

【図1】



【図2】



【図 3】

MetSerIlePheSerLysTyrGluGlyLeu	AlaSerAlaLeuSerAlaValThrAlaAsp	20
GlyGlyArgAsnProPheAsnValValIle	GluLysProIleSerSerThrValGlyLeu	40
IleGluGlyArgGluThrLeuLeuPheGly	ThrAsnAsnTyrLeuGlyLeuSerGlnSer	60
ProAlaAlaIleGluAlaAlaValGluAla	AlaArgAlaTyrGlyValGlyThrThrGly	80
SerArgIleAlaAsnGlyThrGlnGlyLeu	HisArgGlnLeuGluGluArgLeuCysThr	100
PhePheArgArgArgHisCysMetValPhe	SerThrGlyTyrGlnAlaAsnLeuGlyThr	120
IleSerAlaLeuAlaGlyLysAspAspTyr	LeuLeuLeuAspAlaAspSerHisAlaSer	140
IleTyrAspGlySerArgLeuGlyHisAla	GlnValIleArgPheArgHisAsnAspAla	160
AspAspLeuHisLysArgLeuArgArgLeu	AspGlyThrProGlyAlaLysLeuValVal	180
ValGluGlyIleTyrSerMetMetGlyAsp	ValValProMetAlaGluPheAlaAlaVal	200
LysArgGluThrGlyAlaTrpLeuLeuAla	AspGluAlaHisSerValGlyValMetGly	220
GluHisGlyArgGlyValAlaGluSerAsp	GlyValGluAspAspValAspPheValVal	240
GlyThrPheSerLysSerLeuGlyThrVal	GlyGlyTyrCysValSerAsnHisAlaGly	260
LeuAspLeuIleArgLeuCysSerArgPro	TyrMetPheThrAlaSerLeuProProGlu	280
ValIleAlaAlaThrMetAlaAlaLeuThr	GluLeuGluAsnArgProGluLeuArgVal	300
ArgLeuMetAspAsnAlaArgArgLeuHis	AspGlyLeuGlnAlaAlaGlyLeuArgThr	320
GlyProGlnAlaSerProValValSerVal	IleLeuAspAspValAlaValAlaValAla	340
PheTrpAsnArgLeuLeuAspLeuGlyVal	TyrValAsnLeuSerLeuProProAlaThr	360
ProAspGlnHisProLeuLeuArgThrSer	ValMetAlaThrHisThrProGluGlnIle	380
AspArgAlaValGluIlePheAlaValVal	AlaGlyGluMetGlyIleAsnArgAlaAla	400

【図 4】

5'-CTGGCTGCCTGTATCGTCTCTCTCAAGCAG-3'

【図 5】

5'-ACGGCTGCAGCTGGTCTGCCTGCCGTATCT-3'

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 酢酸菌の酢酸耐性に関与する新規な遺伝子を提供すること、及び該遺伝子を用いて微生物、特に酢酸菌の酢酸耐性を向上させる方法、さらに酢酸耐性が向上した酢酸菌を用いて、より高酢酸濃度の食酢を効率良く製造する方法を提供する。

【解決手段】 酢酸菌の染色体DNAライブラリーから、通常は増殖できない酢酸濃度の培地でも増殖を可能にさせる遺伝子を取得する方法により、グルコンアセトバクター属に属する実用酢酸菌から酢酸耐性を実用レベルで向上させる機能を有する新規な遺伝子をクローニングした。また、該遺伝子を酢酸菌に導入した形質転換株においては、顕著に酢酸耐性が向上し、エタノール存在下で該形質転換株を通気培養した場合に、増殖誘導期を短縮させ、増殖速度も向上させることができ、さらに最終到達酢酸濃度を顕著に向上させることを可能とした。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[398065531]

1. 変更年月日	1998年10月20日
[変更理由]	新規登録
住 所	愛知県半田市中村町2丁目6番地
氏 名	株式会社ミツカングループ本社